مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۴، سال ۱۳۸۴ (۹۱۶-۹۱۱)

تجزیه و تحلیل ژنتیکی عطر و طعم برنج به کمک نشانگر رپید و روش کلاسیک

امیر توسلی[1]، قربانعلی نعمت‌زاده[2] و فرشاد رودبارکلاری[3]
۱، محقق ایستگاه تحقیقات کشاورزی داراب
۲، دانشیار دانشکدهٔ کشاورزی ساری، دانشگاه مازندران
۳، مؤسسهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۲۲

خلاصه

برنج یکی از مهمترین گیاهان زراعی بوده و دارای نقش تعیین‌کننده‌ای در اقتصاد کشور می‌باشد. عطر و طعم یکی از صفات مهمی است که نقش اساسی در بازارپسندی و قیمت برنج داراست. در تحقیق حاضر سعی گردید تا کارآیی نشانگر مولکولی (OPAG-08) رپید همبسته با ژن کنترل کنندهٔ عطر و طعم برنج در نسل در حال تفکیک F_2 مورد ارزیابی قرار گیرد و از آن در انتخاب بوسیلهٔ نشانگرهای مولکولی (MAS [1]) استفاده گردد. برای تحقق این موضوع، در سال اول رقم معطر رشتی در رقم غیر معطر IR28 تلاقی داده شد. سپس نسل F_1 را در سال زراعی بعد (سال دوم) کشت کرده و بذر تودهٔ F_2 از آن بدست آمد و در سال سوم بذر F_2 کشت گردید. از DNA تک بوته‌های نسل دوم برای انتخاب گیاهان معطر به کمک نشانگر (OPAG-08) رپید استفاده گردید. بذور حاصل از آن (بذور F_3) نیز برای تست آللی استفاده شدند. نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل فنوتیپی عطر و طعم برنج در نسل F_2 نشان داد که این صفت با دو ژن به نسبت ۱۵:۱ (به ترتیب ارقام معطر:غیر معطر) با احتمال ۹۵ درصد کنترل می‌شود. گیاهان هموزیگوس معطر F_2 در آزمایشگاه از طریق تست آللی بذور F_3 (فنوتیپینگ) مشخص گردیدند. سپس آزمون گیاهان هموزیگوس معطر نسل F_2 از طریق نشانگر مولکولی رپید (ژنوتیپینگ) صورت گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان کارآیی این نشانگر در انتخاب مولکولی (MAS) برابر با ۷۰/۶۲ درصد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: برنج، عطر و طعم، نشانگر رپید، انتخاب به کمک نشانگر (MAS)، تجزیه و تحلیل ژنتیکی

مقدمه

کیفیت برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهمترین خصوصیات گیاه برنج می‌باشد که تأثیر زیادی بر قیمت و ارزش آن در بازار، همچنین مشتری‌پسندی آن دارد. اصلاح ارقام پرمحصول با کیفیت مطلوب مستلزم شناخت ماهیت ژنتیکی ارقام خصوصاً عطر و طعم آنها می‌باشد (۲۰).

مطالعات زیادی برای درک کنترل ژنتیکی عطر و طعم برنج انجام گردیده است. تاکنون تکنیک‌های زیادی برای تشخیص و ارزیابی عطر و طعم و چگونگی توارث این صفت در برنج بکار گرفته شده است. از بین همهٔ ترکیبات معطر شناخته شده، مادهٔ ۲- استیل – ۱ - پیرولین مهم‌تر از بقیهٔ ترکیبات معطر فرار شناخته شده است و وجود این ماده در تمام قسمت‌های گیاه

1. Marker Assisted Selection

مکاتبه کننده: امیر توسلی
e-mail: amirtavassoli@usa.com

بجز ریشه به اثبات رسیده است (۱۹). وجود این ماده معطر در بیشتر ارقام معطر برنج از قبیل باسماتی، دلا، جاسمین و عنبربو استخراج و اندازه‌گیری شده است (۲، ۵، ۶، ۱۱، ۲۱).

نعمت‌زاده و همکاران (۱۳۸۱) با اندازه‌گیری مقدار مادهٔ ۲-استیل-۱- پیرولین در ارقام دلا، باسماتی ۳۷۰، عنبربو، آمل۳ و تلاقی‌های دلا در باسماتی۳۷۰ و دلا در آمل۳ از طریق گازکروماتوگرافی، این ماده را ترکیب مهمی جهت وجود عطر و طعم عنوان نمودند و نیز آنها بین میزان این ماده در ارقام معطر اختلاف معنی‌داری را گزارش کردند.

از آنجایی که مبنای انتخاب در پروژه‌های اصلاح نباتات، خود صفت مورد نظر می‌باشد، از این‌رو می‌توان با استفاده از نشانگرهای ملکولی مسیر اصلاح را کوتاه و دقیق‌تر نمود. انتخاب به کمک نشانگرهای ملکولی (MAS)، روشی است که ژن یا ژن‌های مورد نظر را می‌توان بر اساس پیوستگی که با یک نشانگر ژنتیکی دارند تشخیص داده و انتخاب نمود (۱).

انتخاب به کمک نشانگر، در حقیقت می‌تواند انتخاب در نسل‌های اولیه باشد. همچنین انتخاب صفاتی که امتیازدهی آنها مشکل است را ساده می‌سازد. استفاده از قدرت انتخاب به کمک نشانگرها نسبت به اصلاح سنتی صرفه‌جویی در هزینه‌ها را در بر دارد (۲۴). در انتخاب به کمک نشانگرها گزینش برپایهٔ ژنوتیپ نشانگر (نه برپایهٔ فنوتیپ آن) که به ژن مورد نظر همبستگی داشته انجام می‌گیرد (۹).

در این راستا پینسون (۱۹۹۴) معتقد به وجود یک ژن مغلوب در رقم معطر جاسمین ۸۵ و لاین PI 467917 و دو ژن مغلوب در رقم دراگون آی بال ۱۰۰ بود. او همچنین معتقد بود یکی از این دو ژن با ژن کنترل‌کنندهٔ عطر و طعم در رقم جاسمین ۸۵ و لاین PI 467917 دارای لوکوس مشترک بوده است.

نعمت‌زاده (۱۹۹۵) از ۵۵۰ آغازگر رپید برای نشانمند کردن ژن (های) کنترل کنندهٔ عطر و طعم در برنج استفاده کرد و تنها دو آغازگر OPAG-08 و AN-01 بین ارقام معطر و غیر معطر چندشکلی ایجاد کردند. آغازگر اولی در ارقام معطر ایجاد یک باند ۸۰۰ bp (با فاصلهٔ ۶/۹ سانتی مورگان) و دومی در ارقام غیرمعطر ایجاد دو باند ۱۲۰۰ bp و ۹۰۰ bp (با فواصل ۸/۹ و ۱۶/۴ سانتی مورگان) نمود. سپس با استفاده از نشانگر RFLP نتایج نشانگر رپید را تأیید و مشخص نمود که نشانگر OPAG-08 بر روی کروموزوم شمارهٔ ۸ برنج قرار داشته و با نشانگرهای RG978 وRZ617 همبستگی شدیدی داشته و فاصلهٔ آنها به ترتیب ۱/۷ و ۲/۱ سانتی مورگان بوده است.

جین و همکاران (۱۹۹۶) تعداد ۳۰۰ آغازگر تصادفی را مورد بررسی قرار دادند و به یک نشانگر رپید با استفاده از آغازگر OPC-06 دست یافتند که در ارقام برنج غیرمعطر باندی را بطول ۱/۵ kbp ایجاد می‌نمود. لازم به ذکر است که رقم معطری که آنها مورد بررسی قرار دادند KDML 105 و رقم غیرمعطر آنها CT9993 بوده است.

لوریکس و همکاران (۱۹۹۶) ارتباط RG28 را با ژن *fgr* (ژن کنترل‌کنندهٔ عطر و طعم) تأیید کردند و آنرا در حدود ۵/۸ سانتی مورگان بدست آوردند. همچنین دو مکان کمی جهت کنترل صفت معطر بودن؛ یکی بر روی کروموزوم ۴ و دیگری بر روی کروموزوم ۱۲ را مشخص نمودند.

زنگ و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که با کاربرد نشانگرهایی که فاصلهٔ آنها از ژن مطلوب کمتر از ۵cM باشد، دقت انتخاب ۹۹/۷۵٪ خواهد بود. مطالعهٔ یو و همکاران (۱۹۹۱) نشان داد که در آزمون نتاجی (جامعهٔ F_3) که برای بررسی میزان دقت انتخاب به کمک نشانگر در تعیین ژن مقاوم *Xi-21* (سوختگی باکتریایی در برنج) بر اساس نشانگر STS با آغازگر pTA248 صورت گرفت میزان دقت آن ۹۱ درصد بود.

هیتال مانی و همکاران (۱۹۹۵) مطرح کردند که پس از شناخت مارکر جانبی RG456 دقت انتخاب در تشخیص گیاهان هموزایگوت مقاوم به بلاست در یک جامعهٔ در حال تفرق F_2، صد درصد بود. بنابراین دقت انتخاب به کمک نشانگر با استفاده از نشانگرهای جانبی و فاصلهٔ آنها تا ۵ cM با ژن هدف از حداقل ۹۹/۷ درصد برخوردار می‌باشد.

اگرچه روش‌های مختلف ارزیابی عطر و طعم برنج توسط محققان مختلف ارائه گردید اما برای تسهیل در انتخاب مخصوصاً در نسل‌های در حال تفکیک استفاده از نشانگرهای مولکولی از جمله رپید باعث تشخیص سریع و انتخاب در نسل‌های اولیه از اهمیت خاصی برخوردار است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از رقم رشتی (والد معطر)، رقم IR28 (والد غیر معطر)، نتاج F_1 و F_2 حاصل از تلاقی آن‌ها استفاده گردید. والدین تلاقی در سال ۱۳۷۷ در مزرعهٔ آزمایشی معاونت مؤسسهٔ برنج در آمل کشت و با هم تلاقی داده شدند. در سال ۱۳۷۸ بذرهای ۲۰ بوتهٔ F_1 برداشت و نسل F_2 تلاقی بدست آمد. پس از کاشت بذور و انتقال نشاءها به زمین اصلی، برگ‌های ۲۰۰ بوتهٔ F_2 (در هنگام حداکثر پنجه‌زنی) به آزمایشگاه منتقل گردید. از بذور بدست آمده از هر تک بوته F_2 نیز تعداد ۱۰ بذر بطور تصادفی انتخاب شده و طبق روش سود و صدیق (۱۹۷۸) اقدام به تشخیص وجود یا عدم وجود عطر در تک‌بذرها گردید. از فنوتیپ بذور F_3 یا همان آزمون نتاج به ژنوتیپ F_2 (خالص یا ناخالص بودن بوته‌های F_2 از لحاظ صفت عطر و طعم) پی برده شد. DNA تک تک بوته‌های جامعهٔ در حال تفکیک F_2 طبق روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) استخراج گردید. پس از کنترل کیفیت و کمیت DNA ها، DNA مساوی از افراد خالص نسل دوم با هم مخلوط و به صورت تجزیه و تحلیل توده‌ای (BSA) از طریق تکثیر با استفاده از آغازگر (OPAG-08 با توالی `5 – AAGAGCCCTC – 3`) اقدام به آنالیز رپید گردید. از DNA های رقیق شده در آنالیز رپید طبق ترکیب زیر استفاده شد. در هر واکنش ۲۵ میکرولیتری، ۲/۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱ میلی‌مولار، ۱/۵ واحد آنزیم DNA تک پلی‌مراز، ۳ میکرولیتر DNA (با غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۳/۲ میکرولیترکلرید منیزیوم با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار اضافه گردید. تیوب حاوی مواد فوق را در دستگاه ترموسایکلر با پروفیل حرارتی ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه برای عمل جداشدن دو رشته DNA از همدیگر برای یک بار و ۴۵ سیکل متوالی که شامل ۱ دقیقه ۹۴ درجه سانتیگراد، جهت جدا شدن دو رشته DNA در هر سیکل، ۱ دقیقه ۳۸ درجه سانتیگراد، جهت اتصال آغازگرها به توالی‌های مکمل خود در رشته‌های DNA و ۲ دقیقه ۷۲ درجهٔ سانتیگراد جهت تکثیر رشته‌های جدید استفاده گردید.

پس از اتمام عمل PCR، فرآورده‌های حاصل را در ژل آگاروز ۱/۵ درصد تزریق کرده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به کمک دستگاه عکسبرداری با UV عکسبرداری انجام گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار Photocapture، اندازهٔ باندهای بدست آمده از طریق مقایسه با باندهای نشانگر وزنی مشخص گردید. همچنین برای تصحیح درصد نوترکیبی از ضریب هالدین طبق روش زیر استفاده گردید (۱۰):

$$\theta \text{ (درصد نوترکیبی)} = \frac{\text{تعداد افراد نوترکیب}}{\text{تعداد کل افراد هموزیگوس جمعیت } F_2} \times ۱۰۰$$

$$X = -۰/۵ \, Ln \, (۱-۲\theta) \text{ (فاصلهٔ ژن تا نشانگر)}$$

$$۱۰۰ - X = \text{میزان کارآیی بدست آمده}$$

نتایج

نتایج آزمون فنوتیپی حاکی از آن است که این صفت توسط دو ژن مغلوب کنترل می‌شود. زیرا کای اسکور بدست آمده (χ^2=۰/۱۴) با نسبت ژنتیکی ۱:۱۵ بین افراد غیرمعطر به معطر با کای اسکور جدول با احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی داری نداشت ($\chi^2_{۰/۰۵\,(۱)}$=۳/۸۴). بطور کلی نسبت‌های بدست‌آمده برای گیاهان برنج معطر به غیرمعطر گوناگون بوده و برخی از آنها عبارتند از ۱:۳ (۱۷، ۱۸)، ۳:۱ (۲۳، ۲۰، ۳، ۲، ۱۹، ۴، ۱۲ و ۱۶)، ۷:۹ (۲۳، ۲۵)، ۱۳:۳ (۱۴، ۲۶)، ۱:۱۵ (۸)، ۱۵:۱ (۲۲، ۱۳، ۲۷)؛ که از جمعیت در حال تفرق ایجاد شده از تلاقی بین ارقام معطر و غیر معطر گزارش شده‌اند. در حقیقت صفت عطر و طعم دارای یک محدودهٔ کمی جهت ارزیابی می‌باشد و نمی‌توان آن را تنها به دو گروه معطر و غیرمعطر دسته بندی نمود و نیز طبق پژوهش نعمت‌زاده و همکاران (۱۳۸۱) که میزان ترکیب معطر (۲- استیل ۱- پیرولین) را بصورت کمی از طریق گازکروماتوگرافی اندازه‌گیری نموده بودند، اختلاف معنی‌داری بین میزان این ماده در بین ارقام معطر گزارش کردند. از این رو می‌توان به این نکته اذعان داشت که احتمالاً این صفت بصورت کمی کنترل شده و جهت شناسایی ژن‌های مربوط به آن می‌بایست از QTL ها کمک گرفت.

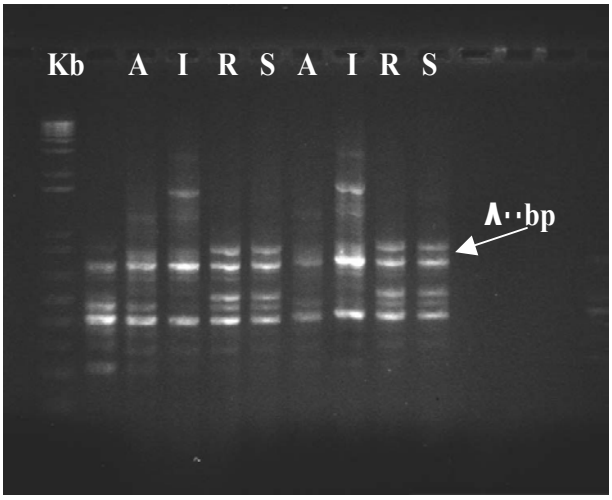
نتایج بدست آمده پس از آنالیز DNA رقم رشتی (معطر) و IR28 (غیرمعطر) با آغازگر رپید OPAG-08، نشان داد که این نشانگر در ارقام معطر رشتی و صدری دارای باندی به اندازهٔ ۸۰۰bp می‌باشد در حالی که در ارقام غیرمعطر IR28 و آمل۳ چنین باندی دیده نشد (شکل۱). این بررسی، نتایج نعمت‌زاده (۱۹۹۵) را در همبستگی OPAG-08 با ژن عطر و طعم برنج تأیید می‌نماید. پس از آزمودن والدین برای وجود باند مورد انتظار، کلیهٔ افراد هموزیگوس F_2 (معطر یا غیرمعطر خالص) مورد آزمون رپید قرار گرفتند (شکل۲) و پس از مقایسه بین نتایج تجزیه و تحلیل فنوتیپی با ژنوتیپی (جدول۱)، درصد نوترکیبی بر اساس نسبت افراد نوترکیب برابر ۲۲٪ محاسبه گردید و پس از اعمال ضریب تصحیح هالدین، درصد نوترکیبی به فاصله برحسب سانتی‌مورگان برابر ۲۹/۳۸ سانتی‌مورگان برآورد شده است.

درصد نوترکیبی و ضریب تصحیح هالدین عبارتند از:

$$\theta \text{ (درصد نوترکیبی)} = \frac{\text{تعداد افراد نوترکیب}}{\text{تعداد کل افراد هموزیگوس جمعیت } F_2} \times ۱۰۰ = \frac{۴}{۱۸} \times ۱۰۰ = ٪۲۲$$

$$X = -۰/۵ \, Ln \, (۱-۲\theta) = ۲۹/۳۸ \, cM \quad \text{(فاصلهٔ ژن تا نشانگر)}$$

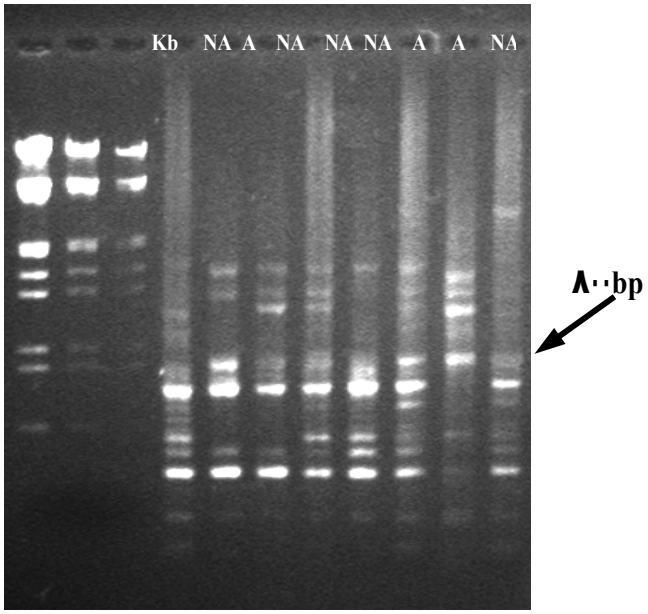
$$\text{میزان کارآیی بدست آمده} = ۱۰۰-۲۹/۳۸ = \%\, ۷۰/۶۲$$



شکل۱- ارقام رشتی و صدری (معطر) و IR28 و آمل۳ (غیر معطر) در آزمون رپید با استفاده از آغازگر OPAG-08 (Kb= مارکر وزنی 1Kb Plus DNA Ladder، A= آمل۳، I= IR28، R= رشتی و S= صدری).

جدول۱- آزمون لینکاژ بین نشانگر مولکولی رپید (OPAG-08) با ارزیابی فنوتیپی.

شمارهٔ بوته	باند (ارزیابی ژنوتیپی)	عطر (ارزیابی فنوتیپی)	شمارهٔ بوته	باند (ارزیابی ژنوتیپی)	عطر (ارزیابی فنوتیپی)
۱	-	-	۸۵	+	-
۳	-	-	۹۱	-	-
۱۱	+	-	۱۱۶	-	-
۱۷	+	-	۳۳	+	+
۳۱	-	-	۳۵	+	+
۳۷	-	-	۶۰	+	+
۵۵	-	-	۶۷	+	+
۵۷	+	-	۸۲	+	+
۶۸	-	-	۱۰۳	+	+



شکل۲- تعدادی از افراد F_2 در آزمون رپید با استفاده از آغازگر OPAG-08، A= بوتهٔ معطر و NA= بوتهٔ غیرمعطر، Kb= مارکر وزنی 1Kb Plus DNA Ladder.

بحث

تجزیه و تحلیل لینکاژ یا همبستگی OPAG-08 با ژن عطر و طعم در تلاقی رقم رشتی (معطر) با رقم IR28 (غیرمعطر) نشان داد که این نشانگر با ژن اصلی عطر و طعم برنج همبستگی دارد. فاصلهٔ نشانگر مورد نظر با ژن عطر و طعم نیز ۲۹/۳۸ سانتی مورگان و میزان کارآیی استفاده از این نشانگر ۷۰/۶۲ درصد برآورد گردید. بنا به نتایج حاصله اینگونه تصور

می‌شود که نشانگر OPAG-08 که بر روی کروموزوم شمارهٔ ۸ قرار دارد، نشانگر اصلی بوده و همبستگی زیادی با ژن اصلی کنترل‌کنندهٔ عطر و طعم داراست. از سوی دیگر نسبتهای گوناگونی که تاکنون بدست آمده توارث منوژنیک این صفت را زیر سؤال می‌برد. همچنین با توجه به نسبت ۱۵:۱ بدست آمده در این پژوهش از نظر کلاسیک وجود دو ژن غالب توأم را معرفی می‌کند. در ضمن اختلاف در میزان عطر در ارقام مختلف هم می‌تواند دلیل کاملتری برای این موضوع باشد. پس می‌توان نتیجه را بدینصورت عنوان نمود که این صفت زمانی که ژن اصلی – همبسته با OPAG-08 - وجود داشته باشد، تظاهر کرده و در صورت بروز ژن دیگر – که توالی نشانگر همبسته با آن هنوز بدست نیامده است؛ میزان عطر در ارقام مذکور افزایش خواهد یافت که این نتایج، با نتایج بدست آمده در پژوهش پینسون (۱۹۹۴) نیز مطابقت داشت. از این رو می‌توان از نشانگر OPAG-08 در تفکیک بوته‌های معطر از غیرمعطر برنج در نسل‌های در حال تفکیک استفاده نمود. البته با توجه به غالب بودن این مارکر و وجود حالت Coupling (پیوسته) در این لینکاژ، نمی‌توان از این نشانگر به سادگی در MAS استفاده کرد و تنها می‌توان از این نشانگر در جهت انتخاب در جهت منفی استفاده کرد. یعنی با حذف بوته‌هایی که این نشانگر را دارا نباشند بوته‌های غیر معطر هموزیگوس را حذف کرده و فراوانی افراد معطر را در جمعیت بالا ببریم. همچنین دلیل اصلی فاصلهٔ نسبتاً زیاد این نشانگر با ژن عطر و طعم به خاطر کوچک بودن جامعهٔ در حال تفکیک بوده است. یکی از مشکلات عمدهٔ تحقیق دربارهٔ عطر و طعم برنج این است که چون عطر و طعم برنج در آندوسپرم دانه می‌باشد و هر دانه برنج جامعهٔ در حال تفکیک F_2، دارای یک ژنوتیپ خاص بوده و از طرفی هر دانه برنج حداکثر ۸ الی ۱۰ میلی‌گرم وزن داشته، در نتیجه پس از آرد نمودن تک دانه‌ها (بطور مستقل) حجم بسیار کم نمونه امکان متصاعدشدن عطر و طعم و ارزیابی فنوتیپی آنرا از طریق استشمام کردن بسیار محدود می‌نماید و اگر یکی از بوته‌های ناخالص در گروه افراد غیرمعطر خالص قرار گیرد، باند مذکور را تکثیر خواهد کرد. به این ترتیب در اندازه‌گیری فاصلهٔ دقیق ژن با نشانگر تداخل ایجاد می‌گردد. لذا پیشنهاد می‌گردد این تحقیق در جوامع دیگر حاصل از تلاقی افراد معطر با افراد غیرمعطر و با تعداد نمونه‌های بیشتر صورت گیرد. همچنین استفاده از اندازه‌گیری میزان ۲- استیل ۱- پیرولین (که ارتباط بسیار نزدیکی با عطر و طعم در برنج داراست) توسط دستگاه گازکروماتوگرافی و ارزیابی این صفت با استفاده از ارزیابی صفات کمی می‌تواند نتایج مقبول‌تری را ارائه نماید.

در صورت موفقیت موارد فوق، می‌توان از این نشانگر، جهت ساخت نشانگر STS و نیز استفاده از آن‌ها در انتخاب مولکولی استفاده کرد.

سپاسگزاری

در اینجا برخود لازم می‌دانیم از مدیریت معاونت مؤسسهٔ تحقیقات برنج کشور معاونت مازندران و جناب آقای مهندس اسدا... احمدی‌خواه به خاطر تأمین مواد اولیهٔ ژنتیکی تشکر نمایم. همچنین از اساتید گرانقدر آقایان دکتر حشمت ا... رحیمیان، دکتر نادعلی بابائیان جلودار، دکتر قدرت ا... رحیمی و آقای مهندس سید مهدی علوی که با راهنمایی های خود و یا در اختیار گذاشتن لوازم و برخی از مواد آزمایشگاهی امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال تشکر و قدردانی را بنمائیم.

منابع مورد استفاده REFERENCES

۱. قره یاضی، ب. ۱۳۷۶. کاربرد نشانگرهای دی. ان. آ. در اصلاح نباتات. دانشگاه صنعتی اصفهان. چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات. صفحات ۲۰۰- ۱۶۲.

۲. نعمت‌زاده، ق.، ع. علی‌اکبر، ا. توسلی، ف. فرخزاد، و ا. احمدی‌خواه. ۱۳۸۱. تست آللی برای تعیین رفتار اصلاحی عطر و طعم برنج از طریق گازکروماتوگرافی و صفات مورفولوژیکی. هفتمین کنگرهٔ علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، کرج. صفحات ۴۵۳-۴۵۲.

3. Ahn, S. N., C. N. Bollich, & S. D. Tanksley. 1992. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theor. Appl. Genet. 84: 825-828.

4. Ali, S. S., S. J. H. Jafri, M. Khan, & M. A. Butt. 1993. Inheritance studies for aroma in two aromatic varieties of Pakistan. Int. Rice Res. Newsl. 18(2): 6.
5. Buttery, R. G., B. O. Juliano, & L. C. Ling. 1983. Identification of rice aroma compound 2-acetyl-1-pyrroline in pandan leaves. Chem. Ind. (London), P. 478.
6. Buttery, R. G., J. G. Turnbaugh, & L. C. Ling. 1988. Contribution of volatiles to rice aroma. J. Agric. Food Chem. 36: 1006-1009.
7. Dellaporta, S. L., J. Woods, & J. B. Hicks. 1983. A Plant DNA Minipreparation: version 2, Plant. Molecular Rep. 4(1): 19-21.
8. Dhulappanavar, C. V. 1976. Inheritance of scent in rice. Euphytica 25: 659-662.
9. Dudley, J. W. 1997. Quantitative genetics and plant breeding. Adv. Agron. 59: 1-23.
10. Elsen, J. M. 1993. Detection and use of marker genes in farm animals. INRA-SAGA. 31326 Castanet Tolosan France.113 Pp.
11. Emmanuel, G. 1993. CIRAD. Personal communication with Dr. Ning Huang, IRRI.
12. Garland, S. & R. Henry. 2001. Application of molecular markers to rice breeding in Australia. Molecular markers for the *sd-1* and *fgr* genes. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 21 Pp.
13. Geetha, S. 1994. Inheritance of aroma in two rice crosses. IRRN. 19 (2): 5.
14. Ghose, R. L. M., & W. T. Butany. 1952. Studies on the inheritance of some characters in rice (*Oryza sativa* L.). Indian J. Genet. Plant Breed. 12: 26-30.
15. Hittalmani, S., M. R. Foolad, T. Mew, R. L. Rodriguez, & N. Huang. 1995. Development of PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, *Pi-2*(t) in a segregating population. Theor. Appl. Genet. 91: 9-14.
16. Jin, Q. S., A. Vanavichit, & S. Tragoonrung. 1996. Identification and potential use of a RAPD marker for aroma in rice. J. Genet. & Breed. 50: 367-370.
17. Jodon, N. E. 1944. The inheritance of flower fragrance and other characters in rice. Jour. Amer. Soc. Agron. 36: 844-848.
18. Kadam, B. S. & V. K. Patankar. 1938. Inheritance of aroma in rice. Chron. Bot. 4: 496-497.
19. Lorieux, M., M. Petrov, N. Huang, E. Guiderdoni, & A. Ghesquière. 1996. Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. Theor. Appl. Genet. 93: 1145-1151.
20. Nematzadeh, GH. 1995. Mapping gene(s) for grain quality in rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and RFLP marker. Thesis Ph. D. University of Philippines. Los Banos. Philippines. 99 Pp.
21. Paule, C. M. & J. J. Powers. 1989. Sensory and chemical examination of aromatic and nonaromatic rices. J. Food Sci. 54: 343-346.
22. Pinson, S. R. M. 1994. Inheritance of aroma in six rice cultivars. Crop Sci. 34: 1151-1157.
23. Sood, B. C. & E. A. Siddiq. 1978. A rapid technique for scent determination in rice. Indian J. Genet. Plant Breed. 38: 268-271.
24. Stromberg, L. D., J. W. Dudley, & G. K. Rufener. 1994. Comparing conventional early Generation selection with molecular marker assisted selection in maize. Crop Sci. 34: 1221-1225.
25. Tripathi, R. S. & M. J. B. K. Rao. 1979. Inheritance and linkage relationship of scent in rice. Euphytica 28: 319-323.
26. Tsuzuki, E. & E. Shimokawa. 1990. Inheritance of aroma in rice. Euphytica 46: 157-159.
27. Vivekanandan, P. & S. Giridharan. 1994. Inheritance of aroma and breadthwise grain expansion in Basmati and non-Basmati rices. IRRN. 19 (2): 4-5.
28. Yu, Z. H., D. J. Mackill, J. M. Bonman & S. D. Tanksley. 1991. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 81: 471-476.
29. Zheng, K., N. Huang, J. Bennett, & G. S. Khush. 1995. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. IRRI discussion paper series No. 12. P. 24. IRRI, Los Banos, Philippines.